

552,447

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

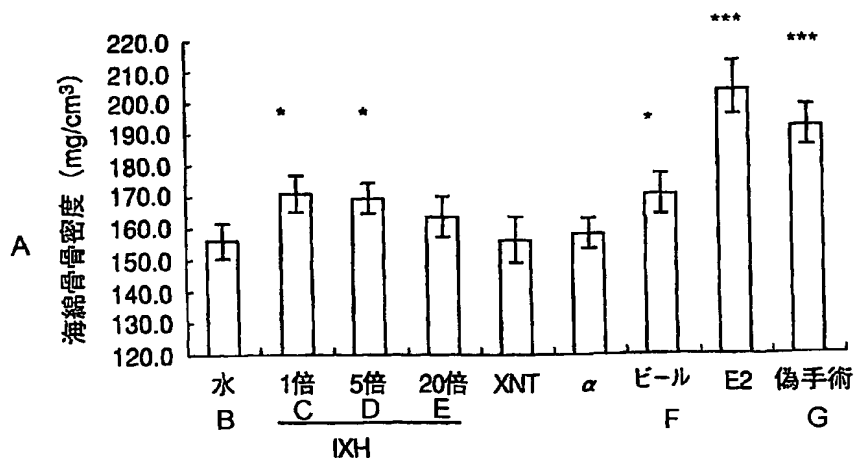
(10) 国際公開番号  
WO 2004/089359 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 31/12, (72) 発明者; および  
A61P 19/10, A23L 1/30, 2/38 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 田嶋 修 (TAJIMA, Osamu) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 研究開発部 食品安全センター内 Gunma (JP). 形山 幹生 (KATAYAMA, Mikio) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 研究開発部 食品安全センター内 Gunma (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005087
- (22) 国際出願日: 2004 年 4 月 8 日 (08.04.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2003-104515 2003 年 4 月 8 日 (08.04.2003) JP (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目 10 番 1 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITION OR PREVENTION OF BONE DENSITY LOWERING AND REFRESHMENT THEREFOR

(54) 発明の名称: 骨密度減少の抑制または予防用組成物および飲食品



A...DENSITY OF CANCELLOUS BONE

B...WATER

C...1-FOLD

D...5-FOLD

E...20-FOLD

F...BEER

G...SHAM SURGERY

(57) Abstract: A composition for inhibition or prevention of bone density lowering, comprising isoxanthohumol or an isomerized hop extract as an effective ingredient; or a refreshment for such a use. Inhibition or prevention of bone density lowering, while avoiding the problem of possible side effects upon use of estrogen preparations, can be attained by the use of such a composition or refreshment.

[続葉有]

WO 2004/089359 A1



NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 骨密度減少の抑制または予防用組成物および飲食品

## [発 明 の 背 景]

発明の分野

本発明は、骨密度減少の抑制または予防用組成物、および飲食品に関する。さらに詳しくは、本発明は、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物、および骨粗鬆症の予防、治療または改善用の飲食品に関する。

背景技術

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の破綻とによって特徴づけられる疾患であり、骨の脆弱性亢進と骨折危険率の増大に結びつく疾患である。骨粗鬆症は世界中で大きな健康問題となっており更年期女性の3人に1人、高齢者の多くが男女とも罹患している。骨粗鬆症による骨折は、例えば日本国において「寝たきり」となる原因の第3位であり、医療費の増加を招く原因の一つにもなる。また、高齢化社会の進展に伴い、その患者数はさらに増加するものと考えられる。このため、骨粗鬆症を予防、治療または改善するための医薬の開発はきわめて重要であるといえる。

40歳代以降に徐々に進行する骨量減少の要因は、加齢に伴って腸管からのカルシウム吸収性が低下するためであり、また体内ビタミンD<sub>3</sub>量の低下によりカルシウムに関するホメオスタシスを保つために副甲状腺ホルモンの分泌が亢進するためと推定される。中でも女性の場合には、骨形成を促進し、かつ、骨吸収を抑制していた女性ホルモンが更年期に減少し、その結果、急激な骨量減少がもたらされることが多い。

現在までのところ、臨床的に使用されている骨粗鬆症治療製剤としては、例えば、ビタミンD製剤、カルシトニン製剤、エストロゲン製剤、イブリフラボン製剤、ビタミンK<sub>2</sub>製剤、タンパク同化ステロイド製剤、およびビスホスフォネート製剤が知られている。このうちエストロゲン製剤は、閉経後骨粗鬆症の予防または治療に有効であることが知られているが、不正出血、乳がんや子宮ガンの発

生リスクを上昇させるなど副作用が伴うことが知られている。

薬剤による骨粗鬆症の治療は、長期間にわたることが多く、投与の長期化による副作用の発現など種々の問題が無視できない。このため、現在までのところ、薬剤による骨粗鬆症の治療は、根本的な治療を目的としたものではなく、疾病の進行を抑制するなどの対症療法によるものである。

また、骨粗鬆症に関しては予防的な措置を講じることは極めて重要であると考えられている。しかしながら、薬剤投与による日常的な骨粗鬆症の予防は、経済性、安全性の面から実現されるには至っていない。

したがって、安全性に優れ、日常的に使用可能な骨粗鬆症の予防または治療剤が望まれている。この場合、食経験のある食品から、骨粗鬆症の予防または治療効果のある成分を見出すことは、安全性の面からも望ましいといえる。

一方、薬物投与療法以外の骨粗鬆症の予防のためには、カルシウムをはじめとする種々の栄養素の適切な摂取と同時に過剰なアルコール摂取の制限、禁煙、運動などの生活習慣の改善が提言されている。薬物は、生体にとって異物であり、副作用を念頭においた治療が必要であることから、非薬物的な治療法は有効である。中でも、日々摂取する食事による療法は重要であると考えられており、骨粗鬆症の予防、治療または改善に効果のある優れた食品の開発が望まれている。

ホップは、ヨーロッパ原産のクワ科多年草（学名：Humulus lupulus）であり、一般的には、その毬果（雌花が成熟したもの）をホップと呼んでいる。ホップは、ビールの苦味、香りづけに用いられることで有名であり、長く人々が摂取してきている。この苦味および香りは、ホップのルブリン部分（毬果の内苞の根元に形成される黄色の顆粒）よりもたらされる。ホップは、民間薬としても用いられており、鎮静効果、入眠および安眠効果、食欲増進、健胃作用、および利尿作用などの生理効果が知られている。

ホップ成分であるフムロン類やキサントフモールについては、in vitroの実験によって骨吸収抑制作用を有していることが示されている（特開平7-330594号公報、特開平7-285856号公報、および Biosci Biotech Biochem 61(1), 158-159 (1997)）。また、ビール摂取によって骨密度の減少が抑制され、これがホップ由来の活性であることも報告されている（形山幹生ら、「骨粗鬆症

モデルラットにおけるビールの骨密度減少抑制効果」、第56回日本栄養・食糧学会大会 講演要旨集（社団法人日本栄養・食糧学会）、平成14年（2002年）6月20日発行、326頁、31-10p）。

ホップにエストロゲン活性があることは以前から知られている（例えばMunch. Med. Wschr. 95, 845 (1953)）。また1999年になって、ホップから女性ホルモン活性物質として8-プレニルナリングニンが単離されている（J. Clinical Endocrinology & Metabolism 83(6), 2249-2252 (1999)）。したがって、その活性に基づき、8-プレニルナリングニン含量を著しく高めたホップ濃縮物を閉経後骨粗鬆症の予防または治療に利用することも考えられるが、エストロゲン製剤の場合と同様に副作用を生じるリスクがある。

ホップ成分の異性化物としては、例えばイソフムロン類（イソ $\alpha$ 酸類）、イソキサントフモールが知られている。これらは、ビール製造の過程（麦汁煮沸工程中）において、添加されたホップ成分が異性化されることによってビール中に生じる。因みに、ビール中のイソキサントフモール含有量は、0.04～3.4 mg/Lであるとの報告がある（J. Chromatogr. A 832 (1999) p97-107）。同様にビール中のイソフムロン類の含有量は、最も含有量の多いと思われるタイプのビール（Foreign Extra Stout: Guinness Malaysia Berhad 社製：出典 Brauindustrie）で約60 mg/Lであるとの報告がある。

WO 01/76614には、植物由来の成長因子産生増強物質を含む食品および飲料等が開示されており、この成長因子産生増強物質としてイソキサントフモールが挙げられている。またこの成長因子産生増強物質が、肝細胞増強因子（HGF）および神経成長因子（NGF）の産生増強作用を有し、肝障害、胃腸障害、肺炎、糖尿病等の疾患の治療用途へ利用可能なことも開示されている。

しかしながら、イソキサントフモールの骨粗鬆症改善作用に関しては本発明者らの知る限り、何も知られていない。イソフムロン類は、前記特開平7-330594号公報において、フムロン類と併記して有効成分として挙げられているが、ここにはイソフムロン類が骨吸収抑制作用を有するとの具体的証拠は一切示されていない。

## [発明の概要]

本発明者らは、今般、ビール等に含まれる異性化されたホップ由来成分が、骨密度減少を抑制もしくは予防する優れた効果を有することを見出した。この効果は、骨粗鬆症の予防、治療または改善に有効であると考えられるものであった。またこの効果がイソキサントフモールに基づくものであって、イソキサントフモールの効果はその類似化合物であるキサントフモールの効果に比べてより優れていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

よって本発明は、骨粗鬆症を予防、治療または改善するために用いられる組成物および飲食品であって、優れた安全性と活性を有するもの提供をその目的とする。

本発明による骨密度減少の抑制または予防用組成物は、イソキサントフモールを有効成分として含んでなる。また本発明によるこの組成物は、イソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを、有効成分として含んでなるものであってもよい。

本発明による骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物は、イソキサントフモールを有効成分として含んでなる。

また本発明による骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物は、イソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを有効成分として含んでなる。

本発明による骨密度減少の抑制もしくは予防用の飲食品は、イソキサントフモール、またはイソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを含んでなるものである。

本発明による非穀物-ホップ発酵型の飲食品は、成人1日あたりのイソキサントフモール摂取量が0.003~0.5mg/kg体重となる量でイソキサントフモールを有効成分として含んでなるものである。

本発明の別の態様によれば、本発明による非穀物-ホップ発酵型の飲食品は、1回当たりのイソキサントフモール摂取量が、0.2~30mgとなる量でイソキサントフモールを有効成分として含んでなるものである。

本発明による組成物または飲食品の有効成分は、骨密度減少を抑制または予防する優れた効果を有するものであり、さらに骨密度を増大させる効果を示すこと

も期待される。この有効成分は、長年飲食品として飲用されてきたビール等に含まれている。したがって、本発明による組成物または飲食品は、患者または骨粗鬆症の予防を望む者が長期間にわたって服用または喫食しても副作用がほとんどなく、安全性に優れている。また、本発明による組成物または飲食品は、目的とする効果が期待される用量の1000倍以上の用量の場合であっても、幼若ラットに対してエストロゲン作用が見られない。このため、本発明によれば、エストロゲン製剤の場合のようなエストロゲン作用を介した副作用、例えば、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生リスクの上昇を回避しつつ、骨粗鬆症の予防、治療または改善に関する優れた効果を得ることができる。

#### [図面の簡単な説明]

図1は、実施例の試験2の結果を示すグラフである。グラフは、MCF-7細胞の増殖を指標とする、イソキサントフモールおよび8-プレニルナリングニンのエストロゲン活性を示す。図中、IXHはイソキサントフモール、8PNは8-プレニルナリングニン、およびE2は17 $\beta$ -エストラジオールを表す。

図2は、実施例の試験3-aの結果を示すグラフである。グラフは、幼若ラットに対するイソキサントフモールおよび8-プレニルナリングニンのin vivoエストロゲン作用を調べた結果を表す。図中、IXHはイソキサントフモール、8PNは8-プレニルナリングニン、およびE2は17 $\beta$ -エストラジオールを表す。また\*は $P < 0.05$ および\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

図3は、実施例の試験3-bの結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモール、8-プレニルナリングニン、およびビールのin vivoエストロゲン作用を調べた結果を表す。図中、IXHはイソキサントフモール、および8PNは8-プレニルナリングニンを表す。また\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

図4は、実施例の試験3-bの結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモール、およびビールのin vivoエストロゲン作用を調べた結果を表す。図中、IXHはイソキサントフモール、およびE2は17 $\beta$ -エストラジオールを表す。また\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

図5は、実施例の試験4の結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモール、8-プレニルナリングニン、およびビールの骨密度減少抑制作用を調べた結果を表す。図中、IXHはイソキサントフモール、および8PNは8-プレニルナリングニンを表す。また\*は $P < 0.05$ および\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

図6は、実施例の試験4の結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモール、キサントフモール、イソ $\alpha$ 酸およびビールの骨密度減少抑制作用を調べた結果を表す。図中、IXHはイソキサントフモール、XNTはキサントフモール、 $\alpha$ はイソ $\alpha$ 酸含有ホップエキス、およびE2は $17\beta$ -エストラジオールを表す。また\*は $P < 0.05$ および\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

図7は、実施例の試験5の結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモールを添加した麦茶の骨密度減少抑制作用を調べた結果を表す。図中、0mg/Lはイソキサントフモールを添加していない麦茶を表し、2mg/L、10mg/L、および50mg/Lはイソキサントフモールを添加した麦茶であって、それぞれのイソキサントフモール濃度を表し、E2は $17\beta$ -エストラジオールを表す。また、水を投与したコントロール群に対して\*は $p < 0.05$ 、\*\*は $p < 0.01$ 、および\*\*\*は $p < 0.001$ であることを意味し、またイソキサントフモールを添加していない麦茶に対して、#は $p < 0.05$ 、##は $p < 0.01$ であることを意味する。

図8は、実施例の試験5の結果を示すグラフである。グラフは、卵巣摘出ラットに対するイソキサントフモールを添加した緑茶の骨密度減少抑制作用を調べた結果を表す。図中、0mg/Lはイソキサントフモールを添加していない緑茶を表し、10mg/Lはイソキサントフモールを添加した緑茶であってそのイソキサントフモール濃度が10mg/Lであることを表し、E2は $17\beta$ -エストラジオールを表す。また、水を投与したコントロール群に対して\*は $p < 0.05$ 、\*\*は $p < 0.01$ 、および\*\*\*は $p < 0.001$ であることを意味し、またイソキサントフモールを添加していない緑茶に対して、#は $p < 0.05$ 、##は $p < 0.01$ であることを意味する。



## [発明の具体的説明]

イソキサントフモール

本発明による組成物および飲食品は、前記したように、有効成分としてイソキサントフモール、またはイソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを含んでなる。

イソキサントフモールは、市販のキサントフモール（例えば、Apin chemical 社より入手可能）、またはホップより精製される高純度のキサントフモールの、異性化することによって得ることができるものである。

ホップからのキサントフモールの精製は、例えば下記のようにして行うことができる。乾燥ホップをエタノール抽出し、ろ過後ろ液を減圧濃縮する。次いで、得られた濃縮物に、ヘキサンと 85 % エタノール水溶液を用いた液-液分配処理を行って、エタノール水溶液層を分取し、この層を減圧下で濃縮する。得られた濃縮物をクロロホルム：ヘキサン（5：2）に溶解させ、シリカゲル系カラムに通して、得られる画分の内から、キサントフモール溶出画分を分取する。分取された画分の溶出液を減圧濃縮し、ヘキサンおよび酢酸エチルを用いた再結晶法を繰り返すことによって、精製キサントフモールを得ることができる。

キサントフモールの異性化は、キサントフモールの、アルカリまたは酸化マグネシウムの存在下において加熱するか、またはその他の公知の方法にキサントフモールの付すことによって行うことができる。

異性化処理の具体例を挙げると、キサントフモールのエタノール等のアルコール性溶媒に溶解した後、ここに弱アルカリ性の水を加えて、その存在下において加熱（例えば、92～93℃程度）して還流することによって、キサントフモールの熱異性化して、イソキサントフモールとすることができる。異性化処理により得られたイソキサントフモールは、必要に応じて、公知の方法（例えば、ろ過、減圧濃縮、凍結乾燥等）により濃縮したり、精製したりすることができる。

### 異性化ホップエキス

本発明において、異性化ホップエキスとは、ホップから抽出処理等により得られるキサントフモール含有ホップエキスを異性化することによって得られるホップエキスを意味する。すなわち、異性化ホップエキスは、基本的には、ホップのルプリン部に由来する抽出物（ホップエキス）を得、これを積極的に異性化することによって得られるものである。

ホップエキスは、例えば毬花やその圧縮物をそのままもしくは粉碎した後、抽出操作に供することによって、調製することができる。

抽出操作としては、例えば、ビール醸造に用いられるホップエキスの調製法として用いられる、エタノール溶媒による抽出法が挙げられる。また該抽出操作としては、その他の一般に用いられるホップ抽出法を採用してもよい。例えば、

（１）溶媒中にホップの毬花、その粉碎物などを冷浸、温浸等によって浸漬する方法；（２）加温し攪拌しながら抽出を行い、濾過して抽出液を得る方法；または（３）パーコレーション法等も、前記抽出操作において適用することができる。

これら抽出操作によって得られた粗抽出物は、必要に応じて、ろ過または遠心分離に付すことによって固形物を除去することができる。得られた液は、これをそのままホップエキスとして用いてもよいが、そこに含まれる溶媒を留去して一部を濃縮または乾燥させた後、用いてもよい。また、濃縮または乾燥後に得られた抽出物は、さらに非溶解性溶媒を用いて洗浄して精製してもよく、またこれをさらに適当な溶剤に溶解もしくは懸濁させてもよい。さらに本発明においては、得られたホップエキス（液体）を、減圧乾燥、凍結乾燥等の慣用の手段によって、ホップ抽出エキス乾燥物として、これを使用してもよい。

前記抽出において使用可能な溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノール等の炭素数１～４の低級アルコール；酢酸エチルエステル等の低級アルキルエステル；エチレングリコール、ブチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどのグリコール類；エチルエーテル、アセトン、酢酸等の極性溶媒；ベンゼンやヘキサン等の炭化水素；エチルエーテルや石油エーテルなどのエーテル類等の非極性溶媒の公知の有機溶媒が挙げられる。これら溶媒は、２種以上を組み合わせてもよい。

本発明の一つの好ましい態様によれば、エタノール、水などの溶媒を用いてキサントフモールを含む抽出液を得、該抽出液を超臨界二酸化炭素抽出法に付して、そこに含まれる $\alpha$ 酸、および $\beta$ 酸画分を除去することによって、キサントフモールをより多く含むホップエキスを得ることができる。この場合、必要に応じて、前記ホップエキスから不溶物をろ過によって除去したり、減圧等により濃縮して溶媒を乾固させてもよい。

このようにして得られたホップエキスは、キサントフモールを少なくとも含有するものである。このとき、得られたホップエキスが、キサントフモールに加えその異性化物であるイソキサントフモールを極少量含む場合がある。このような場合、このホップエキス（非異性化ホップエキス）を本発明においてそのまま使用してもよい。しかしながら、通常は、このホップエキスをさらに異性化することによって、異性化ホップエキスを得、これを本発明において使用する。

ホップエキスの異性化は、ホップエキスを、アルカリまたは酸化マグネシウムの存在下において加熱するか、またはその他の公知の方法にホップエキスを付すことによって行うことができる。これにより、ホップエキス中のキサントフモールはイソキサントフモールに変換される。

異性化処理の具体例を挙げると、キサントフモールを含むホップエキスを、エタノール等のアルコール性溶媒に溶解した後、ここに弱アルカリ性の水を加えて、その存在下において加熱（例えば、 $92\sim 93^{\circ}\text{C}$ 程度）して還流することによって、ホップエキスを熱異性化して、イソキサントフモールを含む異性化ホップエキスを得ることができる。得られた異性化ホップエキスは、必要に応じて、公知の方法（例えば、ろ過、減圧濃縮、凍結乾燥等）により濃縮したり、精製したりしてもよい。なお、前記異性化処理において使用する弱アルカリ性（例えば、 $\text{pH } 8.5\sim 9.5$ ）の水として、例えば、飲料用アルカリイオン水などのような市販の水（例えば、ボトルドウォーター）を使用することが、安全性の観点からは望ましい。市販の飲料の水であれば、摂取されてきた経験が充分にあるなど、安全性が高い。また、ビール醸造の麦汁煮沸過程で熱異性化されて生成する反応様式と前記異性化処理は本質的に同等であるので、飲食品を提供する観点からは安全性が高い。

したがって、本発明の一つの好ましい態様によれば、異性化ホップエキ스는、エタノール系溶媒による抽出により得られたキサントフモール含有ホップエキスを、異性化することによって得られるものである。より好ましくは、このとき異性化は、ホップエキスを、アルカリ性の水中において加熱還流することによって行われる。ここでエタノール系溶媒とは、主としてエタノールまたはエタノールと水とからなる溶媒などをいう。

本発明においては、前記異性化処理により得られた異性化ホップエキスを組成物または飲食品の製造に直接使用しても良いが、好ましくは、その中の有効成分をさらに高濃度で含有する分画物を入手してこれを使用する。

したがって本発明の好ましい態様によれば、本発明による組成物または飲食品の有効成分として使用する異性化ホップエキ스는、ホップエキスを単に異性化して得られるものよりもさらに高いイソキサントフモール濃度を有するものであることができる。

本発明においては、種々の方法で抽出された市販のホップエキスを入手して、これを異性化して異性化ホップエキスとして使用してもよいが、市販されている異性化ホップエキスをそのまま使用してもよい。

また前記したイソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキ스는、ホップより抽出されたホップエキスを異性化して得られる通常の異性化ホップエキスを、慣用の方法にしたがって、濃縮したり、イソキサントフモールを添加したり、またはイソキサントフモール以外の成分を除去したりすることによって、容易に得ることができる。

また市販のホップエキスとして、例えば、ホップ毬花粉砕物をエタノール抽出した後、超臨界点炭酸抽出法により分画し、キサントフモール含有量を高めてなるホップエキス（例えば、Xanthohumol-enriched hop product（商品名）、Hopsteiner社より入手可能）、および、キサントフモールが約80%含まれる製品（Xantho-pure（商品名）、Hopsteiner社より入手可能）が存在する。これらを異性化することによって、イソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキスを製造することができる。

なお、これらのエキスより、さらに有効成分を高濃度に含有する分画物を前記

等の方法も含めて濃縮して得ることができることは言うまでもない。

本発明のより好ましい態様によれば、本発明による組成物または飲食品の有効成分として使用する異性化ホップエキスは、イソキサントフモールを、0.005～90重量%含有してなるものであり、さらに好ましくは、8～90重量%含有してなるものである。

また、飲食品において、飲食品の製造工程に加熱工程等のキサントフモールを異性化する工程がある場合には、前述したホップエキス、好ましくは通常のホップエキスに比べてキサントフモール含有量を高めたホップエキスを、飲食品の当該加熱工程前に加えておくことによって、最終製品中にイソキサントフモールを含有させてもよい。このような飲食品の代表的な例として、ビール、発泡酒等を挙げることができる。ビール、発泡酒では、麦汁煮沸工程で上記ホップエキスを添加することにより、最終製品中にイソキサントフモールを含有させることができる。キサントフモール含有量を高めたホップエキスをこのような形で使用すれば、ビールの苦味成分であるイソフムロン類の濃度を必要以上に高めることなく（すなわち過度の苦味を与えることなく）、イソキサントフモールを高濃度に含有した製品を製造できる。もちろんこのような異性化工程がある場合でも、前述のように、精製イソキサントフモール、或いは、キサントフモール含有量を高めたホップエキス（例、Xanthohumol-enriched hop product（商品名）、Hopsteiner社より入手可能）、さらにキサントフモールが約80%含まれる製品（Xantho-pure（商品名）、Hopsteiner社より入手可能）等を異性化してなるイソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキスを、製造工程または最終製品に添加する態様を除外するものではない。

## 用途

卵巣摘出した動物およびヒトにおいては、破骨細胞の活性化、および骨吸収の増加が認められる。しかしながら、通常、女性ホルモンを加えることによりこれらに伴う骨量の減少は見られなくなる。このような作用がどのようにして発現するかはまだ明らかではないが、骨吸収に関与するサイトカインIL1、IL6、TGF $\beta$ 、プロスタグランジンEなどが複雑に関与していると考えられている。

また、女性ホルモンの欠乏によって、骨吸収が亢進することに加え、小腸からのカルシウム吸収が抑制されることも骨量減少の原因と考えられる。

さらに、女性ホルモンは核内レセプターと結合することによってその活性を発現するが、近年、 $\alpha$ 、 $\beta$ の2つのタイプのレセプターが存在することが明らかとなっている。近年、ある器官には女性ホルモンとして作用するが、別の組織に対しては拮抗的に作用する薬剤（SERM）の開発が進んでおり、副作用の少ない薬剤として期待が寄せられている。このように器官によって作用が異なるメカニズムを2種類のレセプタータイプから説明することが検討されている。

閉経性の骨粗鬆症の発症メカニズムは複雑多岐にわたり、いまだ解明されていない部分も多く、エストロゲンアゴニスト活性のみから閉経後骨粗鬆症の予防、治療の有効性を説明するのは限界がある。事実、例えば日本国においては、その副作用からエストロゲンアゴニスト活性がない製剤が主として臨床的に使用されている。

後記する卵巣摘出ラットを用いた実施例の試験4に示すように、イソキサントフモールは、卵巣からのエストロゲン分泌が遮断されることによる骨密度低下を有意に改善した。このことから、イソキサントフモールは、破骨細胞に直接的または間接的に作用して骨吸収を抑制している可能性が推測される。一方、実施例の試験2に示すようにイソキサントフモールにはin vitroの実験においてエストロゲン活性を有することが明かになっているが、幼若ラットにおいては卵巣摘出ラットで認められた骨密度減少改善作用が発現する1000倍以上の投与量においても、子宮肥大作用が認められなかった（後述する実施例の試験3参照）。このことから、イソキサントフモールは、女性ホルモンである $17\beta$ -エストラジオールとは異なる機構、すなわちエストロゲンレセプターとの相互作用はあるものの、子宮よりも骨組織への選択性が高いものと推測される。

したがって、従来のエストロゲン製剤による薬物療法の場合には、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生リスクの上昇などの副作用が懸念されるのに対して、本発明による有効成分を用いた場合には、前記副作用を回避しつつ、骨粗鬆症を予防、治療、または改善することができる。

したがって、本発明による組成物または飲食品は、骨密度減少の抑制、改善も

しくは予防を目的として使用することができる。可能であれば、本発明による組成物または飲食品を、骨密度を増大させるために使用してもよい。よって、本発明による組成物または食品は、骨粗鬆症の予防、治療または改善に用いることができる。

ここで「骨密度」とは、対象となる哺乳動物の骨における、一定容積当たりのカルシウム等のミネラル量のことをいい、慣用の方法により測定することができる。そのような慣用の方法としては、X線を用いる方法（例えば、DXA法、MD法、pQCT法）および超音波を用いる方法（例えば、QUS法）が挙げられる。本発明においては、例えば、後述する実施例の試験4にしたがって測定することができる。

本発明によれば、有効量のイソキサントフモールまたはイソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを哺乳動物に投与するかまたは摂取させることを含んでなる、哺乳動物の骨密度減少を抑制または予防する方法が提供される。また本発明によれば、予防、治療または改善上の有効量のイソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを、哺乳動物に投与するかまたは摂取させることを含んでなる、骨粗鬆症を予防、治療または改善する方法が提供される。ここで「有効量」は、後述するようなイソキサントフモールの投与量にしたがって選択することができる。

本発明の別の態様によれば、骨密度減少の抑制もしくは予防用組成物を製造するための、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスの使用が提供される。また本発明のさらに別の態様によれば、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物を製造するための、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスの使用が提供される。

#### 組成物および飲食品

本発明による組成物は、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを有効成分として含んでなるものである。

ここで「有効成分として含んでなる」とは、所望する剤型に応じた薬学上許容されうる担体を含んでいてもよいことは当然として、併用可能な他の薬剤を含有

する場合も包含する意味である。

本発明による組成物は、経口投与または非経口投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤（糖衣錠を含む）、丸剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤が挙げられる。非経口剤としては、注射剤（例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤）、点滴剤、外用剤（例えば、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤）、坐剤（例えば、直腸坐剤、膣坐剤）が挙げられる。これらの製剤は、当分野で通常行われている手法により、薬学上許容されうる担体とともに製剤化することができる。

薬学上許容されうる担体としては、賦形剤、結合剤、希釈剤、添加剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤等が挙げられ、例えば、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、砂糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、澱粉、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、低融点ワックス、カカオバター等を担体として使用することができる。

併用可能な他の薬剤としては、例えば、アミノ酸、抗生物質、ビタミンD製剤、カルシトニン製剤、エストロゲン製剤、イブリフラボン製剤、ビタミンK<sub>2</sub>製剤、タンパク同化ステロイド製剤、およびビスホスフォネート製剤などが挙げられる。

製剤は、例えば下記のようにして製造することができる。

経口剤は、例えば賦形剤（例えば、乳糖、白糖、デンプン、マンニトール）、崩壊剤（例えば、炭酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム）、結合剤（例えば、 $\alpha$ 化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース）、または滑沢剤（例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000）を有効成分に添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマスキング、腸溶性もしくは持続性の目的のため自体公知の方法でコーティングすることにより製造することができる。コーティング剤としては、例えばエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートおよびオイドラギット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合体）、ゼラチン、



プルランなどを用いることができる。

注射剤は、有効成分を分散剤（例えば、ツイーン(Tween) 80（アトラスパウダー社（米国）製）、HCO60（日光ケミカルズ製）、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノール）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、グリセリン、ソルビトール、ブドウ糖、転化糖）などと共に、水性溶剤（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）または油性溶剤（例えば、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、コーン油などの植物油、プロピレングリコール）などに溶解、懸濁または乳化することにより製造することができる。この際、所望により溶解補助剤（例えば、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン）等の添加物を添加してもよい。

外用剤は、有効成分を固状、半固状または液状の組成物とすることにより製造することができる。例えば、上記固状の組成物は、有効成分をそのまま、または賦形剤（例えば、ラクトース、マンニトール、デンプン、微結晶セルロース、白糖）、増粘剤（例えば、天然ガム類、セルロース誘導体、アクリル酸重合体）などを添加して混合し、粉状とすることにより製造できる。上記液状の組成物は、注射剤の場合とほとんど同様にして製造できる。半固状の組成物は、水性もしくは油性のゲル剤、または軟骨状のものがよい。また、これらの組成物は、いずれもpH調節剤（例えば、炭酸、リン酸、クエン酸、塩酸、水酸化ナトリウム）、防腐剤（例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム）などをさらに含んでもよい。

坐剤は、有効成分を油性または水性の固状、半固状または液状の組成物とすることにより製造できる。この場合、油性または水性基剤を使用することができる。該組成物に用いる油性基剤としては、高級脂肪酸のグリセリド（例えば、カカオ脂、ウイテプソル類（ダイナマイトノーベル社製））、中級脂肪酸（例えば、ミグリオール類（ダイナマイトノーベル社製））、または植物油（例えば、ゴマ油、大豆油、綿実油）が挙げられる。水性基剤としては、ポリエチレングリコール類、

プロピレングリコールが挙げられる。また、水性ゲル基剤としては、天然ガム類、セルロース誘導体、ビニール重合体、アクリル酸重合体が挙げられる。

本発明による飲食品は、本発明による有効成分を有効量含有してなるものである。

ここで「有効成分を有効量含有してなる」とは、個々の飲食品を通常喫食される量摂取した結果に、後述するような範囲で有効成分が摂取されるような量で有効成分を含有することをいう。本発明による飲食品には、本発明による有効成分をそのまままたは上記のような組成物の形態で、飲食品に配合することができる。より具体的には、本発明による飲食品は、本発明による有効成分または前述するホップの粉碎物もしくは抽出物をそのまままたは異性化して、飲食品として調製したもの、各種タンパク質、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類等をそれらにさらに配合して調製したもの、または、一般の飲食品へ添加したものであってもよい。

本発明において、「飲食品」は、医薬以外のものであって、哺乳動物が摂取可能なものであれば特に制限はなく、その形態も液状、半液体状または固体状のいずれのものであってもよい。このため飲食品には、例えば飲料の形態も包含される。また飲食品には、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品のような分類のものも包含される。さらに「飲食品」は、ヒト以外の哺乳動物を対象として使用される場合には、飼料を含む意味で用いることができる。

本発明における有効成分は、骨量減少抑制または予防作用を有する。このため、日常摂取する食品やサプリメントとして摂取する健康食品や機能性食品、好適には、カルシウム、マグネシウム等のミネラル類、ビタミンK等のビタミン類を1種以上含有する食品等に、本発明の有効成分を配合することによって、骨粗鬆症の発症の予防、治療および改善、並びに骨粗鬆症予備群の骨粗鬆症への移行防止といった機能を併せ持つ飲食品を提供することができる。

よって、本発明による飲食品は、骨密度を高めることもしくはその低下防止を希望する消費者に適した飲食品、または、骨の健康が気になる消費者に適した飲食品、すなわち所謂、特定保健用食品、として提供することができる。なお、こ

ここでいう特定保健用食品とは、骨密度減少の抑制もしくは予防を目的として食品の製造または販売等を行う場合に、保健上の観点から、各国において法上の何らかの制限を受けることがある飲食品をいう。

飲食品の具体例としては、飯類、麺類、パン類およびパスタ類等の炭水化物含有飲食品；クッキーやケーキなどの洋菓子類、饅頭や羊羹等の和菓子類、キャンディー類、ガム類、ヨーグルトやプリンなどの冷菓や氷菓などの各種菓子類；ジュース、清涼飲料水、乳飲料、茶飲料、機能性飲料、栄養補助飲料、ノンアルコールビール等の各種飲料；ビール、発泡酒等のアルコール飲料；卵を用いた加工品、魚介類（イカ、タコ、貝、ウナギなど）や畜肉（レバー等の臓物を含む）の加工品（珍味類を含む）などが挙げられる。

好ましくは、飲食品は、非穀物-ホップ発酵型の飲食品である。ここで「非穀物-ホップ発酵型の飲食品」とは、少なくともホップと穀物とを原料として発酵を行うことによって得られる発酵成分（例えばビール、発泡酒）を含有しない飲食品をいう。すなわち、非穀物-ホップ発酵型の飲食品とは、ビールおよび発泡酒のような原料としてホップを含む発酵飲料以外の飲食品をいう。飲食品として非穀物-ホップ発酵型のものを使用して、これに、イソキサントフォームを有効量添加することにより、骨の健康の回復、維持または増進を図ることができる。

本発明の一つのより好ましい態様によれば、飲食品としては、茶飲料、乳飲料、ヨーグルトが挙げられる。本発明の別の一つの好ましい態様によれば、飲食品は、飲料である。

ここで茶飲料とは、ツバキ科の常緑樹である茶樹の葉（茶葉）、または茶樹以外の植物の葉もしくは穀類等を煎じて飲むための飲料をいい、発酵茶、半発酵茶および不発酵茶のいずれも包含される。茶飲料の具体例としては、日本茶（例えば、緑茶、麦茶）、紅茶、ハーブ茶（例えば、ジャスミン茶）、中国茶（例えば、中国緑茶、烏龍茶）、ほうじ茶等が挙げられる。

ここで乳飲料とは、生乳、牛乳等またはこれらを原料として製造した食品を主原料とした飲料をいい、牛乳等そのもの材料とするものの他に、例えば、栄養素強化乳、フレーバー添加乳、加糖分解乳等の加工乳を原料とするものも包含される。

またヨーグルトには、ハードタイプ、ソフトタイプ、ドリンクタイプのいずれのものも包含され、さらにヨーグルトを原料とする加工ヨーグルト製品も包含される。

本発明による有効成分またはホップの粉碎物もしくは抽出物を異性化したものを、一般食品の原料に添加配合して食品とする場合は、後述するように、有効成分もしくはホップの苦みが飲食品の味に影響しない範囲で用いるか、または苦味がマスクされるような工夫をすることが好ましい。

また、ビール、ノンアルコールビール、発泡酒などのようなホップ由来の飲食品には、一般的に、本発明における有効成分が既に一定量以上含まれていることがある。すなわち、このような公知のイソキサントフモール含有飲食品は、単にホップ成分を添加したものでなく、ホップ成分が異性化される工程を経て製造された飲食品である。このような飲食品の場合、これらをそのまま本発明による飲食品として使用することができるが、さらに、これら飲食品に、イソキサントフモールもしくはそれを含むエキス、または異性化ホップエキスを配合することによって、所望の効果をさらに増強することができ、または有効摂取量を低減させることができる。

公知のイソキサントフモール含有飲食品の例としては、ビールが挙げられる。ビール中におけるイソキサントフモール含有量は、前記したように例えば0.04～3.4 mg/Lであるが、ビール中には、その苦味成分であるイソフムロン類やエストロゲン活性を有する8-プレニルナリングニンも含有されている。例えば、ビール中における8-プレニルナリングニンの含有量は、イソキサントフモール含有量の6分の1～133分の1と広い幅があることが知られている(J. Chromatogr. A 832, 97-107 1999)。

本発明による飲食品においては、精製したイソキサントフモールを用いるよりは、ホップエキスを異性化させた形で用いることがコスト的な問題からは有利であると考えられる。

また、飲食品中に異性化ホップエキスを使用する場合には、イソフムロン類等により生ずる苦味による官能的な点も考慮することが望ましい。この場合、キサントフモール含有量を高めたホップエキスまたはイソキサントフモール含有量を

高めた異性化ホップエキスをを用いて、イソキサントフモールに対するイソフムロン類の飲食品中における含有量を相対的に低くすることが好ましい。あるいは、苦味成分をマスクした上で、ホップ、ホップエキス、または異性化ホップエキスの添加量を増加させてもよい。

なお、飲食品においても、コスト的な問題がほとんど無いのであれば、精製イソキサントフモールを食品の製造工程または最終製品中に添加してもよいし、または、製造工程中に異性化反応をもたらす工程がある場合には該工程前に精製キサントフモールを添加しておいてもよい。

本発明による組成物または飲食品は、人類が飲食品として長年摂取してきたホップ抽出成分またはその誘導物であることから、毒性も低く、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対し安全に用いることができる。

本発明による組成物を、投与する哺乳動物の骨密度の増大またはその骨密度減少の抑制、改善もしくは予防を目的として用いる場合（好ましくは、骨粗鬆症の予防、治療または改善を目的として用いる場合）、その投与量は、受容者、受容者の年齢および体重、症状、投与時間、剤形、投与方法、薬剤の組み合わせ等に依存して決定できる。例えば、本発明による有効成分を医薬として経口投与する場合、成人一人あたり、 $0.01 \sim 100 \text{ mg/kg}$  体重、好ましくは  $0.02 \sim 50 \text{ mg/kg}$  体重、非経口的に摂取する場合は  $0.005 \sim 10 \text{ mg/kg}$  体重、好ましくは  $0.01 \sim 10 \text{ mg/kg}$  体重の範囲で1日1回または数回の投与単位に分割して投与することができる。

異性化ホップエキスを有効成分として用いた場合には、成人一人あたりの摂取量が、イソキサントフモール量として  $5 \text{ mg/kg}$  体重・日（成人1人1日あたり  $300 \text{ mg}$  の範囲の摂取量）以下の範囲、好ましくは  $1 \text{ mg/kg}$  体重・日以下の範囲となるように投与することができる。

本発明の好ましい態様によれば、本発明による組成物は、成人一人あたりのイソキサントフモール摂取量が、 $0.003 \sim 5 \text{ mg/kg}$  体重・日の範囲（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりのイソキサントフモール摂取量が  $0.2 \sim 300 \text{ mg}$  の範囲）となるような量のイソキサントフモールを含んでなる。より好まし

くは、前記イソキサントフモール摂取量の下限值は、成人一人あたりの摂取量として、 $0.013 \text{ mg/kg}$ 体重・日（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量として  $0.8 \text{ mg}$ ）以上であり、さらに好ましくは、 $0.02 \text{ mg/kg}$ 体重・日（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量として  $1.2 \text{ mg}$ ）以上である。

本発明の好ましい態様によれば、本発明による飲食品は、成人一人あたりのイソキサントフモール摂取量が、 $0.003 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 体重・日の範囲（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりのイソキサントフモール摂取量が  $0.2 \sim 30 \text{ mg}$  の範囲）となるような量のイソキサントフモールを含んでなる。より好ましくは、前記イソキサントフモール摂取量の下限值は、成人一人あたりの摂取量として、 $0.013 \text{ mg/kg}$ 体重・日（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量として  $0.8 \text{ mg}$ ）以上であり、さらに好ましくは、 $0.02 \text{ mg/kg}$ 体重・日（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量として  $1.2 \text{ mg}$ ）以上である。

なおここで、イソキサントフモール摂取量の下限值である、成人一人あたりの摂取量としての  $0.003 \text{ mg/kg}$ 体重・日（（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量としての  $0.2 \text{ mg}$ ）は、後述する実施例の実験4および実験5において、効果の確認されたイソキサントフモール濃度  $2 \text{ mg/L}$  の被験試薬を  $10 \text{ ml/kg}$  投与した場合に相当し、詳しくは、この投与量をラットとヒトの体表面積の比から換算して得られた値である。またこの投与量をラットの体重当たりの値に換算して得られた値は成人一人あたりの摂取量では  $0.02 \text{ mg/kg}$ 体重・日（（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量は  $1.2 \text{ mg}$ ）である。

また飲食品の場合のイソキサントフモール摂取量の上限值が、成人一人あたりの摂取量として  $0.5 \text{ mg/kg}$ 体重・日（（体重  $60 \text{ kg}$  の成人1人1日あたりの摂取量として  $30 \text{ mg}$ ）以下であるとしたのは、イソキサントフモールの溶解度および食経験を考慮したものであり、それ以上の値であっても、骨密度減少の抑制効果が否定されるものではない。したがって、可能であれば、前記上限値以上の量のイソキサントフモールを含む飲食品であってもよい。

本発明の一つの好ましい態様によれば、飲食品は、1回当たりのイソキサントフモール摂取量が、 $0.2 \sim 30 \text{ mg}$ 、より好ましくは $0.8 \sim 30 \text{ mg}$ 、さらに好ましくは $1.2 \sim 30 \text{ mg}$ となる量でイソキサントフモールを含んでなるものである。

ここで「1回当たりのイソキサントフモール摂取量」とは、ヒトが1回当たり喫食行動において摂取する飲食品中に含まれるイソキサントフモール量をいう。したがって、ヒトが1回の喫食行動で摂取することを想定した飲食品がある場合には、「1回当たりのイソキサントフモール摂取量」は、そのような飲食品中に含まれるイソキサントフモール量に相当する。

ヒトが1回の喫食行動で摂取することを想定した飲食品の形態は、飲食品の摂取が予想される対象者の体重、年齢、性別、体力、健康状態等の身体的要因や、摂取が予想される環境または気候等を考慮することにより適宜設定することができる。例えば、そのような飲食品の形態としては、 $100 \sim 500 \text{ ml}$ （好ましくは $100 \sim 350 \text{ ml}$ ）の範囲の量の単位で容器に封入された飲料が挙げられる。

1回で摂取することを想定した飲食品の形態が、 $100 \text{ ml}$ のボトル入り飲料である場合には、その $100 \text{ ml}$ の飲料には、前記イソキサントフモール摂取量（ $0.2 \sim 30 \text{ mg}$ ）に相当する量のイソキサントフモールが含まれることになる。したがって、この飲料のイソキサントフモール濃度は、 $2 \sim 300 \text{ mg/L}$ の範囲となる。同様に、1回で摂取することを想定した飲食品の形態が、 $350 \text{ ml}$ のボトル入り飲料である場合には、その $350 \text{ ml}$ の飲料には、前記イソキサントフモール摂取量（ $0.2 \sim 30 \text{ mg}$ ）に相当する量のイソキサントフモールが含まれることになり、この飲料のイソキサントフモール濃度は、 $0.57 \sim 85.7 \text{ mg/L}$ の範囲となる。

さらに具体例を挙げて説明すると、このような飲食品の形態について、 $100 \text{ ml}$ 、 $200 \text{ ml}$ および $350 \text{ ml}$ の各容量単位のボトル入り飲料中のイソキサントフモール濃度は下記表Aの通りである。

表A

1回当たりのイソキサントフモール摂取量	イソキサントフモール濃度 (mg/L)		
	100ml飲料	200ml飲料	350ml飲料
0. 2~30mg	2~300	1~150	0. 57~85. 7
1. 2~30mg	12~300	6~150	3. 43~85. 7

上記表を利用するかまたは換算して、飲料のイソキサントフモール濃度を設定することによって、所望する容量単位を1回に摂取することを想定した飲料を、容易に調製することができる。

#### [実 施 例]

本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 製造例：

##### 例A： イソキサントフモールの精製

ビール（キリンラガービール（商品名）、キリンビール株式会社（日本国）製）（以下において「ビール」と略す）、およびキサントフモールを多く含む粉末状のホップエキス（Xanthohumol Enriched Product（商品名）およびXanthopure（商品名）、ともにHopsteiner社製）からのイソキサントフモールの精製例を以下に示す。

##### ビールからの精製

ビール1000mlを脱気し、その800mlを1000mlのジエチルエーテルを用いて抽出した。ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。その後、酢酸エチル20mlを加え、再度、無水硫酸ナトリウムで脱水し、約1mlまで減圧濃縮した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Kieselgel60, 10g）を用いて分画した。カラムは30%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて洗浄した後、60%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて溶出した。溶出画分を減圧乾固し、メタノール3mlに溶解させ、さらに蒸留水3ml



1を加え、これをHPLCによりさらに精製した。HPLCの条件は下記の通りであった：

移動層： 45%アセトニトリル、および55%蒸留水、

カラム： YMC-ODS-AQ 25×250mm (YMC社製)、

ガードカラム： YMC-ODS-AQ 25×50mm (YMC社製)、

流速： 10 ml/分、注入量3 ml、

検出器波長： UV 290 nm。

精製されたイソキサントフモールの純度を、HPLC分析および核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定によって確認した。純度確認のためのHPLCの条件は、下記の通りであった：

移動層： A液(アセトニトリル)、B液(蒸留水)、およびA液20%～100%によるグラジエント溶出、

カラム： YMC-hydrosphere C18 4.6×250mm (YMC社製)、

流速： 1 ml/分、注入量5  $\mu$ l、

検出器波長： UV 290 nm。

このHPLC分析によって、イソキサントフモールの純度が98%以上であることが確認された。

精製されたイソキサントフモール1 mgを800 mlの重メタノールに溶解し、核磁気共鳴(NMR)スペクトル装置(JNM-A400(日本電子社製))を用いて<sup>1</sup>H-NMR測定を行った。

このNMR測定によって、単離精製されたイソキサントフモールの化学シフトは文献で報告されている値と一致し、単一組成であることが確認された。

#### ホップエキスからの精製1

ホップエキス(Xanthohumol Enriched Product (商品名)) 1 gを水1 Lに加え、これをオートクレーブにて100℃で120分間煮沸して、異性化した。室温に冷ました後、上清をろ紙を用いてろ過して、ろ液を得た。次いで、ろ液800 mlを1000 mlのジエチルエーテルを用いて抽出した。ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。その後、酢酸エチル20 mlを加え、再度、無水硫酸ナトリウムで脱水し、約1 mlまで減圧濃縮した。これ

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kieselgel60, 10 g) を用いて分画した。カラムは30%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて洗浄した後、60%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて溶出した。溶出画分を減圧乾固し、メタノール3 mlに溶解させ、さらに蒸留水3 mlを加え、これをHPLCによりさらに精製した。HPLCの条件は下記の通りであった：

移動層： 45%アセトニトリル、および55%蒸留水、

カラム： YMC-ODS-AQ 25×250 mm、

ガードカラム： YMC-ODS-AQ 50×25 mm、

流速： 10 ml/分、注入量3 ml、

検出器波長： UV 290 nm。

精製されたイソキサントフモールの純度を、前記したビールからの精製の場合と同様にして、HPLC分析および核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定によって確認した。

HPLC分析によって、イソキサントフモールの純度が98%以上であることが確認された。

NMR測定によって、単離精製されたイソキサントフモールの化学シフトは文献で報告されている値と一致し、単一組成であることが確認された。

#### ホップエキスからの精製2

ホップエキス (Xantho-pure (商品名)) 2.5 gを、50 mlのエタノールに溶解し、ここに50 mlの10 N水酸化ナトリウム水溶液および蒸留水を加え500 mlにメスアップした。これを、沸騰水浴中で1時間煮沸し異性化した後、室温に冷まし、ここに12 Nの塩酸を45 ml添加した。次いで、得られた溶液を、冷却後グラスウールフィルターにて吸引ろ過した。ろ取物に1.2 Lのエーテルおよび0.8 mlの蒸留水を加えて、液液分配抽出を2回行って、得られたエーテル層を減圧乾固した。これに少量の酢酸エチルおよびヘキサンを加えて、再結晶を繰り返し、純度98%以上のイソキサントフモールを得た。

例B： ホップエキスの異性化

キサントフモールを約80%含む市販のホップエキス（Xantho-pure（商品名））18gを、2Lのエタノールに溶解し、ここにpH8.5～9.5の弱アルカリ性のボトルドウォーター（アルカリイオンの水（商品名）、キリンビバレッジ社製）18Lを加えた。これを92～93℃において2時間、還流下で熱異性化した。次いで、不溶物をろ紙にてろ過した後、ろ液を減圧濃縮し、凍結した。これを凍結乾燥することによって、粉末状の異性化ホップエキス約18gを得た。この粉末状異性化ホップエキスは、イソキサントフモールを約70%含有するものであった。

なお、前記例Aの「ホップエキスからの精製2」の欄と同様にして精製を行うことによって、純度98%以上のイソキサントフモールを得ることができた。

例C： 製剤の調製

下記成分を細かく粉末にし、均一な混合物になるように充分攪拌した後、これを0.2gずつプルランカプセルまたはゼラチンカプセルに充填して、カプセル製剤を調製した。

例Bで得られた異性化ホップエキス	20g
コーンスターチ	1880g
ナタネ硬化油	100g

例D： 飲食品の調製（イソキサントフモール含有飲料の調製）

市販の麦茶用の麦40gに、2Lの沸騰した湯を加えた後、これを5分間煮沸して麦茶を抽出した。ここにそれぞれ2mg/L、10mg/L、および50mg/Lの濃度となるようにイソキサントフモールを添加して、イソキサントフモール含有麦茶飲料を調製した。ここでイソキサントフモールは、前記例Aの「ホップエキスからの精製2」において得られたものを使用した。

同様にして、市販の緑茶葉50gに、2Lの沸騰した湯を加えた後、これを5分間煮沸して緑茶を抽出した。ここに10mg/Lの濃度となるようにイソキサントフモールを添加して、イソキサントフモール含有緑茶飲料を調製した。

評価試験：試験 1： ビール中のエストロゲン活性成分の特定1-a) エストロゲン活性の測定法

被検物質のエストロゲン活性を、エストロゲン感受性ヒト乳癌由来MCF-7細胞の細胞増殖を指標として測定した。使用した細胞株は、エストロゲンレセプターを発現しており、エストロゲン様物質の存在下では細胞増殖の亢進が認められるものであった。したがって、この細胞株の細胞増殖をCell Counting Kit（同仁化学研究所製）を用いて測定することによって、エストロゲン活性を測定した。

該Cell Counting KitによるMCF-7細胞の細胞増殖の測定は、細胞内に取り込まれたWST-1試薬〔2-（4，5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2，5-ジフェニルテトラゾリウム，モノナトリウム塩（2-(4,5-dimethylchiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, monosodium salt）〕から生じるフォルマザンを、マイクロプレートリーダー（SOFTmax（Molecular Devices 社製））を用いて450nmの吸光度を測定することによって行った。

より具体的には、Dextran-Coated Charcoal（Sigma社製）に内因性ステロイドを吸着させて除去した牛胎仔血清（Gibco社製）を10%含み、さらにペニシリンおよびストレプトマイシン（それぞれ10000単位、1mg/ml、Gibco社製）、0.1mM非必須アミノ酸（Gibco社製）、1mMビルビン酸ナトリウム（Gibco社製）、および、1μg/mlインスリン（ヒト組換え体 27.5USP unit/mg：（Sigma社製））を含むDMEM培地を用いて、MCF-7細胞を3日間前培養した。このMCF-7細胞の濃度 $8 \times 10^4$  cells/mlの細胞懸濁液を調製し、これを96ウェルプレート上に100μl/ウェルで播種した。培養1日後、ジメチルスルホキシドに溶解した被検物質0.1%(v/v)を含む培地によってウェル内の培地を交換し、さらに培養を続けた。培養4日目に再度被検物質を含む新しい培地でウェル内培地を交換し、培養7日目にCell Counting Kitを用いて細胞増殖を測定した。

なお、陽性対照物質としては、最も強力な内因性エストロゲンである $17\beta$ -

エストラジオール (Sigma社製) のジメチルスルホキシド溶液を用いた。

1-b) ビール中のエストロゲン活性成分の探索

ビールを脱気し、ENV I-18カラム (10 g、60 ml、Supelco社製) に供し、20%、50%、80%メタノール水溶液、およびメタノール各180 mlで順次溶出した。

各画分のエストロゲン活性を前記方法にしたがって測定したところ、80%メタノールおよびメタノールの各溶出画分に活性が確認された。

80%メタノール、およびメタノールの各溶出画分を併せて減圧乾固しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kiesel gel 60, 10g Merck社製) に供し、n-ヘキサン、酢酸エチル：n-ヘキサン=1：7、1：4の混合溶媒、酢酸エチルの順に段階的に溶出した。

得られた各画分のエストロゲン活性を測定したところ、酢酸エチル：n-ヘキサン=1：7、1：4画分に活性が確認された。

これら活性が確認された画分を減圧乾固し、メタノールに溶解してHPLCによる分画に供した。HPLCの条件は下記の通りであった：

移動層： A液 (アセトニトリル)、B液 (蒸留水)、A液40%~100%によるリニアグラジエント溶出、

カラム： YMC-hydrosphere C18 10×250mm (YMC社製)、

ガードカラム： YMC-hydrosphere C18 10×30mm (YMC社製)、

流速： 2.5 ml/分、注入量80 µl、

検出器波長： UV 290 nm。

HPLCによって2分間ごとにフラクションを採取し、各フラクションのエストロゲン活性を前記方法にしたがって測定した。

結果は下記の通りであった。

保持時間14分~16分において得られたフラクション (Fr 8) と、保持時間18分~20分において得られたフラクション (Fr 10) とにそれぞれエストロゲン活性があることが認められた。

この内、Fr 8に含まれる物質の質量 (MS) スペクトル測定を、質量分析計 (DX303 日本電子社製) を用いてEI-MSの手法にしたがって行なったと

ころ、 $m/z$  354 にイオンが観測された。これはイソキサントフモールの標準スペクトルパターンと一致するものであった。さらに、Fr 8 の 5 mg を 600  $\mu$ l の重ジメチルスルホキシドに溶解し、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (UNITY plus 500 型 (バリアン社製)) を用いて  $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR、および NOESY-1D の測定を行ったところ、Fr 8 の活性成分がイソキサントフモールであることが確認された。

また Fr 10 について、HPLC 質量 (MS) スペクトル分析を行った。

分析装置は HPLC (HP1100 (アジレント社製)) にトリプルステージ型質量分析計 (MS/MS) (Quattro Ultima (マイクロマス社製)) を接続して用いた。このときの HPLC 条件は下記の通りであった：

移動層： A 液 (アセトニトリル)、B 液 (蒸留水)、および A 液 55% ~ 90% によるリニアグラジエント溶出、

カラム： Capcell Pack C18 2.0 $\times$ 150mm (株式会社資生堂製)、

流速： 0.2 ml/分、注入量 5  $\mu$ l。

また質量分析計の条件は、イオン化をエレクトロスプレーイオン化方式 (ESI<sup>-</sup>) とし、プリカーサーイオン 338.3、プロダクトイオン 218.8、Collision 電圧 80 V、Collision エネルギー 20 eV とした。

測定の結果、Fr 10 には 8-ブレニルナリングニンが高濃度に含まれていることが確認された。

#### 1-c) ビール中のイソキサントフモールおよび 8-ブレニルナリングニンの分析

ビール 1 ml を、ジエチルエーテル 5 ml を用いて 2 回抽出して、窒素乾固した。これを、内部標準として 2,4-ジヒドロカルコンを 40 ppb 含む 50% メタノール水溶液に溶解し、分析試料とした。

分析装置は HPLC (HP1100 (アジレント社製)) にトリプルステージ型質量分析計 (MS/MS) (Quattro Ultima (マイクロマス社製)) を接続して用いた。このときの HPLC 条件は下記の通りであった：

移動層： A液（アセトニトリル）、B液（蒸留水）、およびA液55%～90%によるリニアグラジエント溶出、

カラム： Capcell Pack C18 2.0×150mm、

流速： 0.2 ml/分、注入量5  $\mu$ l。

質量分析計の条件は、イオン化をエレクトロスプレーイオン化方式（ESI<sup>+</sup>）とし、MRMモードにて両化合物を一斉定量分析した。定量イオンおよびイオン化条件は、イソキサントフモールについては、プリカーサーイオン352.8、プロダクトイオン232.8、Cone電圧80V、Collisionエネルギー18 eVとした。8-プレニルナリングeninについては、プリカーサーイオン338.3、プロダクトイオン218.8、Cone電圧80V、Collisionエネルギー20 eVとした。

分析の結果、試験に用いたビール中のイソキサントフモール濃度は2.1 mg/Lであり、8-プレニルナリングeninの濃度は43  $\mu$ g/Lであった。

#### 試験2： インビトロ (in vitro) におけるエストロゲン活性評価

精製イソキサントフモールおよび化学合成された8-プレニルナリングeninのエストロゲン活性を、試験1と同様にして測定した。ただしこのとき、MCF-7細胞培養用の培地における被検物質の濃度を次のように設定した。

イソキサントフモールは、該培地中の濃度が、 $1.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-6}$ 、 $1.0 \times 10^{-7}$ 、 $1.0 \times 10^{-8}$ 、 $1.0 \times 10^{-9}$ 、および $1.0 \times 10^{-10}$  mol/Lとなるように添加した。

8-プレニルナリングeninは、該培地中の濃度が、 $1.0 \times 10^{-7}$ 、 $1.0 \times 10^{-8}$ 、 $1.0 \times 10^{-9}$ 、 $1.0 \times 10^{-10}$ 、 $1.0 \times 10^{-11}$ 、および $1.0 \times 10^{-12}$  mol/Lとなるように添加した。

陽性対照としての17 $\beta$ -エストラジオールは、該培地中の濃度が、 $6.3 \times 10^{-11}$ 、 $1.6 \times 10^{-11}$ 、 $3.9 \times 10^{-12}$ 、 $1.0 \times 10^{-12}$ 、 $1.0 \times 10^{-13}$ 、および $1.0 \times 10^{-14}$  mol/Lとなるように添加した。

結果は図1に示される通りであった。

イソキサントフモールおよび8-プレニルナリングeninはいずれも、エストロ

ゲン活性を示した。これらの活性をエストラジオールと比較したところ、イソキサントフモールの活性は約  $10^{-5}$  倍、8-プレニルナリングениンは  $10^{-2}$  倍であった。

### 試験3： インビボ (in vivo) におけるエストロゲン活性評価

#### 3-a) 幼若ラットにおける評価

in vivoにおけるエストロゲン作用について、幼若Wistar系雌性ラットを用いて評価した。

使用したラットは次のようにして準備した。まず、20日齢のWistar系雌性ラット（日本チャールスリバー社より入手可能）を各動物の体重差が平均体重の±10%以内となるよう選別後、1群6匹として無作為に群分けし、水およびAIN-76A（日本クレア社製）を自由摂取させ飼育した。

1日間の予備飼育の後、イソキサントフモールまたは8-プレニルナリングениンを、1、5、または25 mg/kg/日で1日1回、3日間、10 ml/kgの液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。コントロール群としては溶媒（落花生オイル）を同様にして経口投与し、また陽性対照としては17β-エストラジオールを用い、これを400 μg/kg/日の量で同様にして経口投与した。最終投与の約24時間後にラットから子宮を摘出し、その重量を秤量することによってin vivoにおけるエストロゲン活性を測定した。

結果は図2に示される通りであった。

イソキサントフモールは、エストラジオール、または8-プレニルナリングениンとは異なって、幼若ラットに対しin vivo エストロゲン活性を有しないか、または極めて微弱な活性を示すに過ぎないことが判明した。

#### 3-b) 卵巣摘出ラットにおける評価

9週齢の雌性SD系ラット（日本チャールスリバー社より入手可能）の両側卵巣を摘出し、1群6匹として無作為に群分けし、水およびAIN-76A（日本クレア社製）を自由摂取させ飼育した。手術翌日より被検物質を1日1回、28日間、10 ml/kgの液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。

イソキサントフモールについては、ビールに含まれる濃度と同等、5倍、20



倍になるように、イソキサントフモールを0.8%エタノール水溶液に溶解したものをそれぞれ調製し、これらを用いた。コントロール群、偽手術群には、0.8%エタノール水溶液を同様にして経口投与した。陽性対照としては17 $\beta$ -エストラジオールを用い、これを2 $\mu$ g/kg/日の量で皮下投与した。

結果は図3および図4に示される通りであった。

卵巣摘出群(OVX)の子宮重量は偽手術群と比較して有意に低く、イソキサントフモール投与群によっても子宮重量の有意な回復は認められなかった。

#### 試験4： 卵巣摘出後骨粗鬆症における骨密度減少に対する改善効果

9週齢の雌性SD系ラットの両側卵巣を摘出し、翌日より被検物質を一日1回、28日間、10ml/kgの液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。

コントロール群、偽手術群には0.8%エタノール水溶液を同様にして経口投与した。陽性対照としては17 $\beta$ -エストラジオールを用い、これを4 $\mu$ g/kg/日の量で皮下投与した。

ビール(国産ピルスナービール)は、イソキサントフモールを2.1mg/L含有し、また8-プレニルナリングениンを43 $\mu$ g/L含有するものである。ここではこれを一度、凍結乾燥した後に水に溶解することによってエタノールを除去して、これを被検物質として試験に供した。

イソキサントフモールについては、ビールに含まれる濃度と同等、5倍、20倍になるように、イソキサントフモールを0.8%エタノール水溶液に溶解したものをそれぞれ調製し、これらを用いた。

さらに、ビールにおける骨粗鬆症の予防活性に寄与する主要成分を同定するために、さらに以下の被検液を調製して試験に供した：

- ・イソ $\alpha$ 酸を30%含むホップエキス(Iso-Extract (Hopsteiner社製))を0.8%エタノール水溶液で希釈した希釈液であって、イソ $\alpha$ 酸濃度がビールと同等濃度(30mg/L)になるよう調製した液、

- ・8-プレニルナリングениンの水希釈液であって、8-プレニルナリングениンがビール中に含まれる濃度と同等になるよう希釈した液、および

- ・イソキサントフモールの異性体であるキサントフモール(Apin chemical

社製)の水希釈液であって、キサントフモールがビールに含まれるイソキサントフモールと同等濃度(2.1 mg/L)となるように調製した液。

骨密度の測定は、ラットの大腿骨を採取し、遠位骨端部の海綿骨骨密度をp QCT (Peripheral Quantitative computed tomography) 骨密度測定装置(XCT-960A (ノーランド・ストラテック社製))を用いて特定することにより行なった。

結果は図5および図6に示される通りであった。

卵巣摘出群(OVX)の大腿骨における海綿骨骨密度は減少していたが、ビールおよびイソキサントフモール投与により有意に改善された。このような改善は、ビール中のエストロゲン活性寄与率が最も大きいと考えられる8-プレニルナリゲニンには認められなかった。また、キサントフモールやイソフムロン類を含むイソ $\alpha$ 酸については、Pit Formation Assayによって骨吸収阻害活性がすでに報告されているが、これらについてもイソキサントフモールのような活性は認められなかった。

前記試験3にもあるように、卵巣摘出ラットにおいては骨密度減少抑制活性を示す用量、および、それよりも20倍の用量の場合でも、イソキサントフモールは子宮重量増加作用を示さなかった。また、幼若ラットにおいては骨密度減少抑制効果が認められる用量の1250倍の投与量においても子宮重量増加作用は認められなかった。

#### 試験5： イソキサントフモール含有飲料のラット骨密度減少に対する改善効果

9週齢の雌性SD系ラットの両側卵巣を摘出し、翌日より被検溶液を一日1回28日間、10 ml/kgの液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。

コントロール群、偽手術群には水を同様にして経口投与した。陽性対照としては、落花生油に溶解した17 $\beta$ -エストラジオールを用い、これを10  $\mu$ g/kg/日の量で皮下投与した。

被検溶液としては、前記例Dにしたがって、下記のものを用意した：

・前記例Dと同様にして抽出された麦茶であってイソキサントフモールを含有していない麦茶、

- ・ イソキサントフォームをそれぞれ2 mg/L、10 mg/L、および50 mg/Lの濃度で含有する麦茶、

- ・ 前記例Dと同様にして抽出された緑茶であってイソキサントフォームを含有していない緑茶、および

- ・ イソキサントフォームを10 mg/Lの濃度で含有する緑茶。

骨密度の測定は前記試験4の場合と同様に行った。

結果は図7および図8に示される通りであった。

卵巣摘出群(OVX)の大腿骨における海綿骨骨密度は、偽手術群と比較して減少していたが、イソキサントフォームを含有する飲料を投与した群の骨密度は水を投与したコントロール群よりも有意に高く、骨密度減少に対する改善効果が認められた。一方、イソキサントフォームを含有しない飲料の場合には、骨密度減少に対する改善効果は認められなかった。

緑茶は、一般的に、骨吸収作用に関わる破骨細胞の活性を抑制することが知られている茶カテキンを多く含むとされてる(Biochem Biophys Res Commun 292(1), 94-101(2002))。しかしながら、イソキサントフォームを含有しない緑茶飲料の場合には卵巣摘出ラットの骨密度減少抑制効果は認められなかった。したがって、緑茶の場合でも、イソキサントフォームを添加することによって初めて骨密度減少に対する改善効果が認められた(図8)。

## 請 求 の 範 囲

1. イソキサントフモールを有効成分として含んでなる、骨密度減少の抑制または予防用組成物。
2. イソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを、有効成分として含んでなる、骨密度減少の抑制または予防用組成物。
3. 異性化ホップエキ스가、エタノール系溶媒による抽出により得られたキサントフモール含有ホップエキスを、異性化することによって得られるものである、請求項 2 に記載の組成物。
4. 異性化が、ホップエキスを、アルカリ性の水中において加熱還流することによって行われる、請求項 3 に記載の組成物。
5. 医薬組成物である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。
6. 骨粗鬆症の予防、治療または改善用である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。
7. イソキサントフモールを有効成分として含んでなる、骨密度減少の抑制または予防用飲食品。
8. イソキサントフモールを含有する異性化ホップエキスを、有効成分として含んでなる、骨密度減少の抑制または予防用飲食品。
9. 異性化ホップエキ스가、エタノール系溶媒による抽出により得られたキサントフモール含有ホップエキスを、異性化することによって得られるものである、請求項 8 に記載の飲食品。

10. 異性化が、ホップエキスを、アルカリ性の水中において加熱還流することによって行われる、請求項9に記載の飲食品。

11. 健康食品、機能性食品、特定保健用食品、または病者用食品である、請求項7～10のいずれか一項に記載の飲食品。

12. 骨粗鬆症の予防、治療または改善用である、請求項7～11のいずれか一項に記載の飲食品。

13. 飲料の形態である、請求項7～12のいずれか一項に記載の飲食品。

14. 非ホップ飲料である、請求項13に記載の飲食品。

15. 茶飲料である、請求項14に記載の飲食品。

16. 乳飲料である、請求項14に記載の飲食品。

17. ヨーグルトである、請求項7～12のいずれか一項に記載の飲食品。

18. 成人1日あたりのイソキサントフモール摂取量が0.003～0.5 mg/kg体重となる量でイソキサントフモールを含んでなる、請求項7～17のいずれか一項に記載の飲食品。

19. 1回当たりのイソキサントフモール摂取量が、0.2～30 mgとなる量でイソキサントフモールを含んでなる、請求項7～17のいずれか一項に記載の飲食品。

20. 成人1日あたりのイソキサントフモール摂取量が0.003～0.5

mg/kg体重となる量でイソキサントフォームを有効成分として含んでなる、非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

21. 1回当たりのイソキサントフォーム摂取量が、0.2～30mgとなる量でイソキサントフォームを有効成分として含んでなる、非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

22. 成人1日あたりのイソキサントフォーム摂取量が0.003～0.5mg/kg体重となる量で、イソキサントフォームを含有する異性化ホップエキスを、有効成分として含んでなる、非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

23. 1回当たりのイソキサントフォーム摂取量が、0.2～30mgとなる量で、イソキサントフォームを含有する異性化ホップエキスを、有効成分として含んでなる、非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

24. 茶飲料である、請求項20～23のいずれか一項に記載の非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

25. 乳飲料である、請求項20～23のいずれか一項に記載の非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

26. ヨーグルトである、請求項20～23のいずれか一項に記載の非穀物-ホップ発酵型の飲食品。

27. 有効量の請求項1～4のいずれか一項に記載の有効成分を、哺乳動物に投与するかまたは摂取させることを含んでなる、哺乳動物の骨密度減少を抑制または予防する方法。

28. 有効量の請求項1～4のいずれか一項に記載の有効成分を、哺乳動物

に投与するかまたは摂取させることを含んでなる、骨粗鬆症を予防、治療または改善する方法。

29. 骨密度減少の抑制または予防用組成物を製造するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の有効成分の使用。

30. 骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物を製造するための、請求項1～4のいずれか一項に記載の有効成分の使用。

1/4

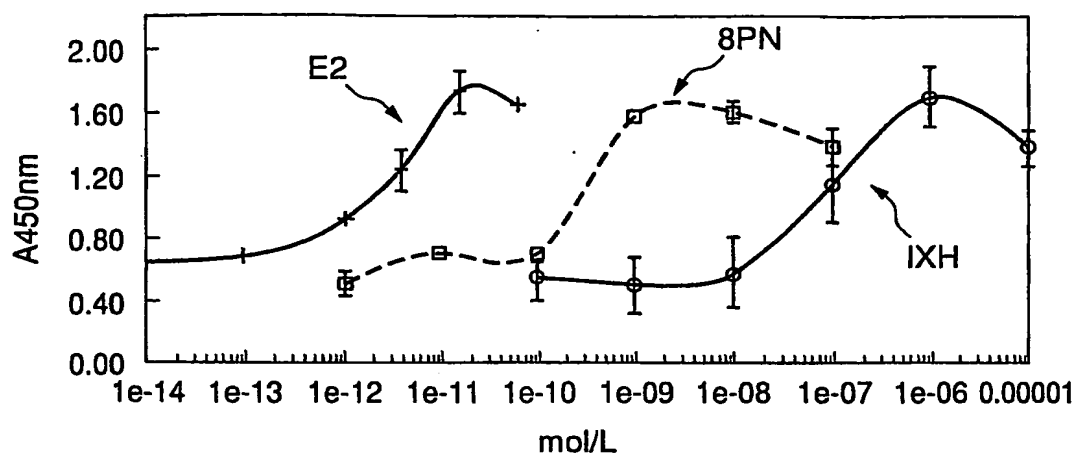


FIG. 1

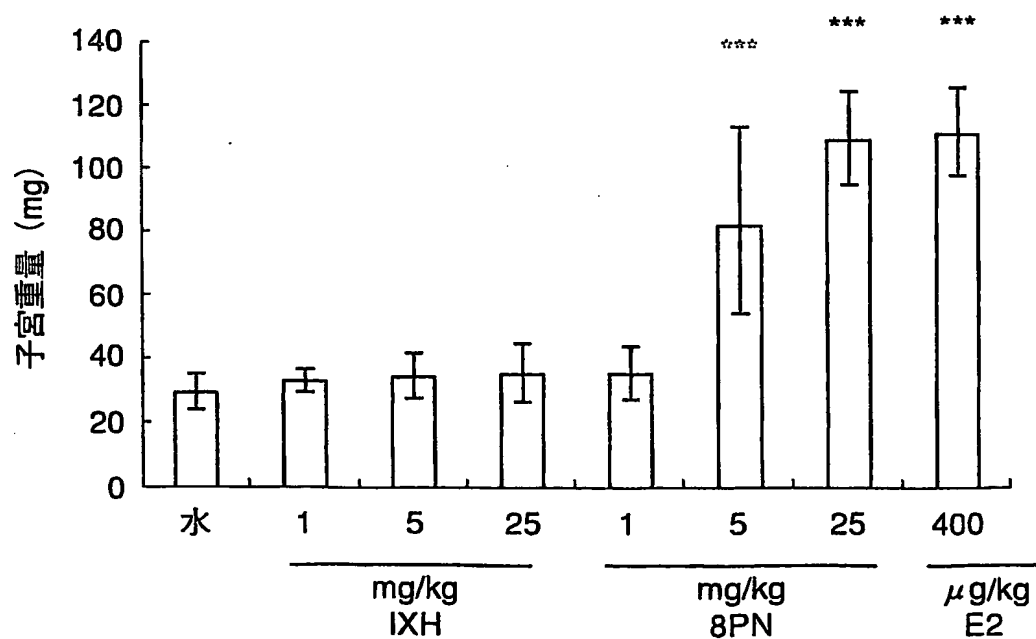


FIG. 2



2/4

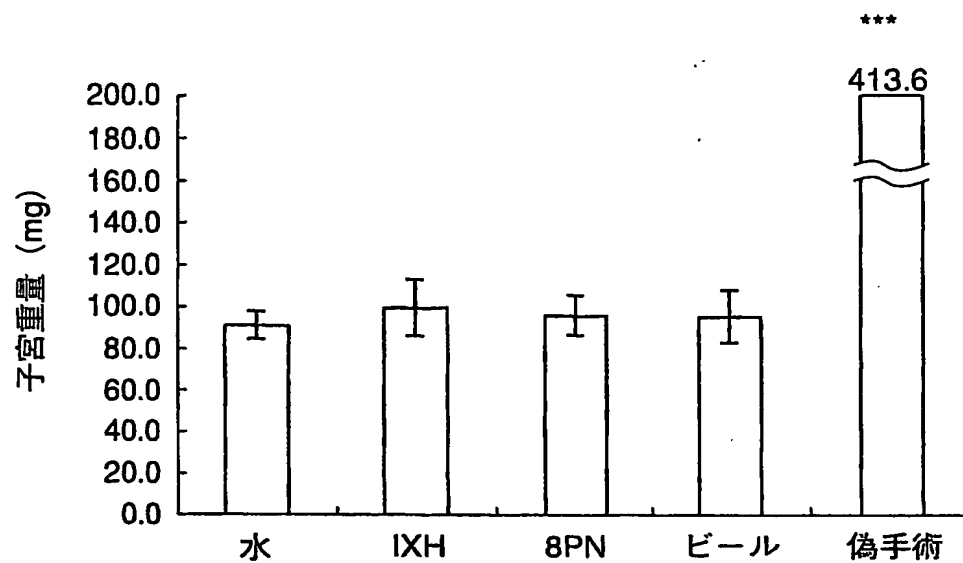


FIG. 3

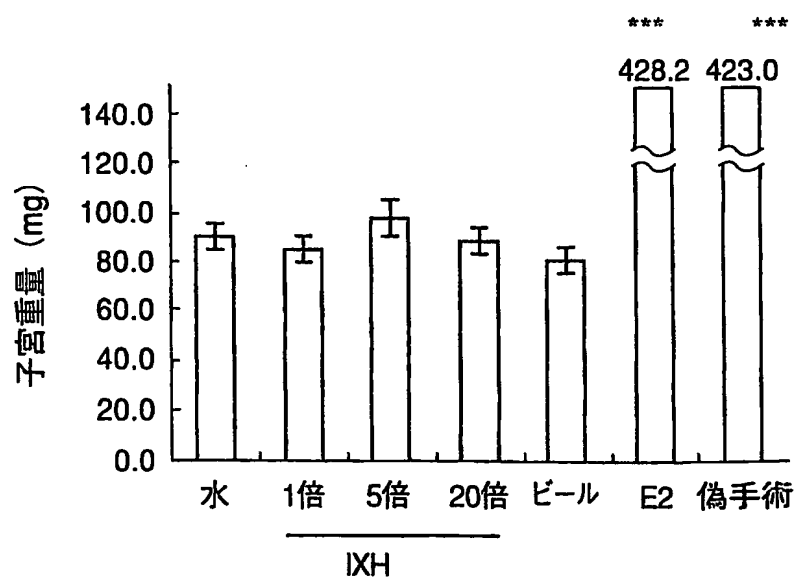


FIG. 4

3/4

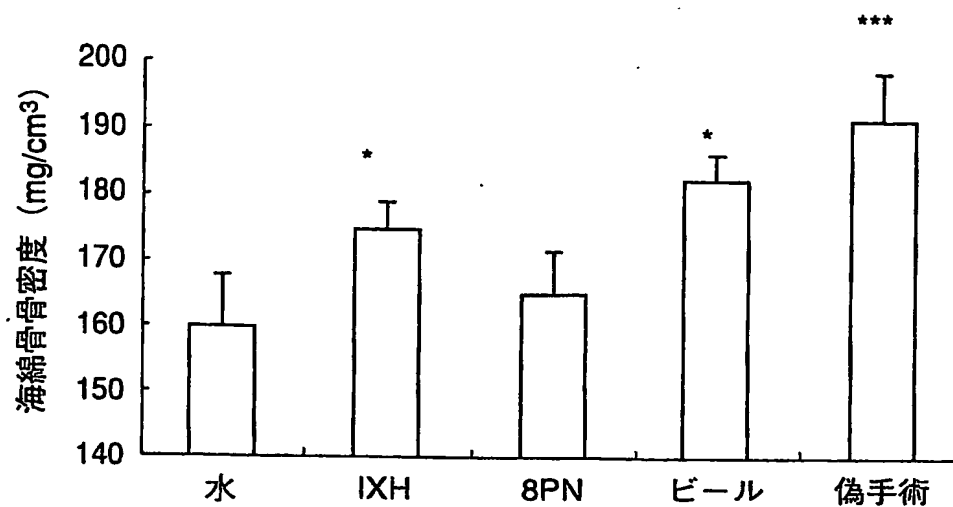


FIG. 5

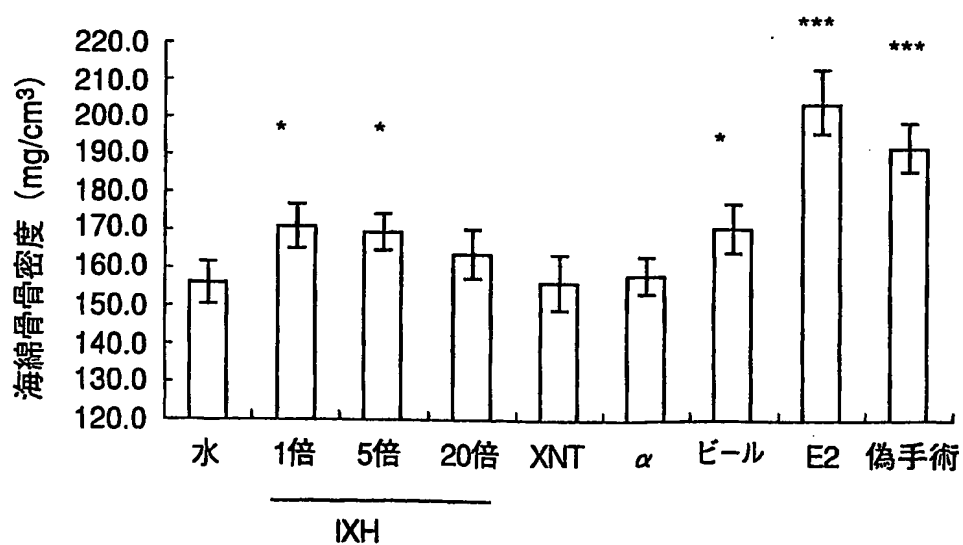


FIG. 6

4/4

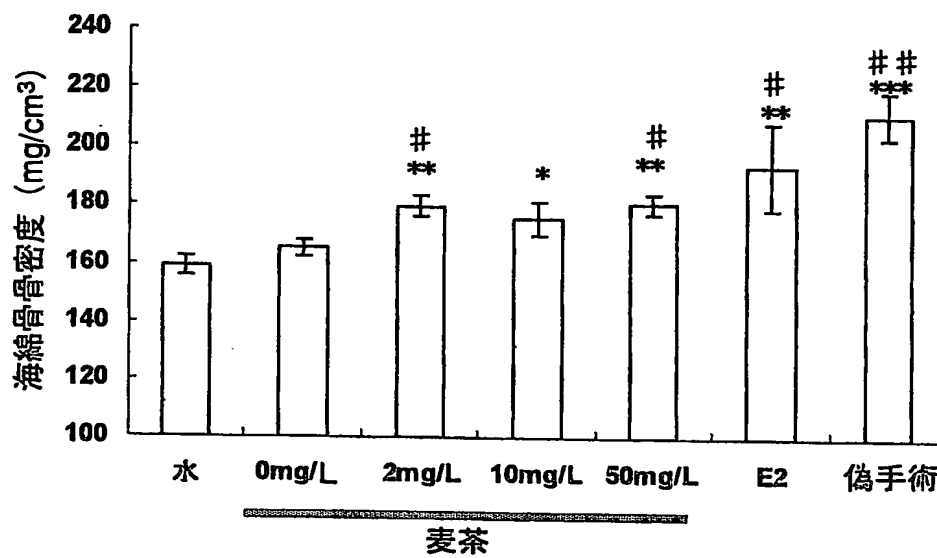


FIG. 7

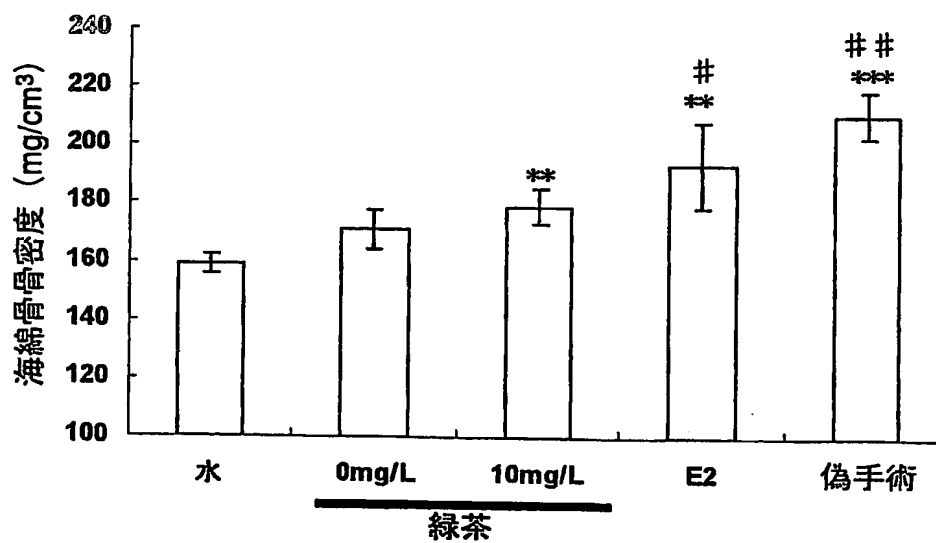


FIG. 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/0005087

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/12, A61P19/10, A23L1/30, 2/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/12, A61P19/10, A23L1/30, 2/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MIDLINE (STN), EMBASE (STN), JSTPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Osamu TATSUTSUMI et al., "Kotsusoshosho Model Rat ni okeru Beer ni Fukumareru Hop Yurai Seibun . no Honemitsudo Gensho Yokusei Koka", Dai 57 Kai The Japanese Society of Nutrition and Food Science Taikai Koen Yoshishu, 01 April, 2003 (01.04.03), page 203	1, 5-7, 11-21, 24-26, 29-30
Y		2-4, 8-10, 22-23
X	WO 03/014287 A1 (DR.WILLMAR SCHWABE GMBH. & CO.), 20 February, 2003 (20.02.03),	1, 5-7, 11-21, 24-26, 29-30
Y	Particularly, table 1; page 8, line 23 & EP 1414937 A1	2-4, 8-10, 22-23
Y	STEVENS, J.F. et al., "Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, Vol.47, No.6, page 2421 to 2428; particularly, Fig. 5	2-4, 8-10, 22-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 May, 2004 (17.05.04)Date of mailing of the international search report  
01 June, 2004 (01.06.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005087

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-285856 A (Hoechst Japan Ltd.), 31 October, 1995 (31.10.95), & EP 679393 A2	1-26, 29-30
A	JP 7-330594 A (Hoechst Japan Ltd.), 19 December, 1995 (19.12.95), & US 5604263 A	1-26, 29-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/005087

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27 to 28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The inventions as set forth in claims 27 to 28 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>7</sup> A61K31/12, A61P19/10, A23L1/30, 2/38			
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> A61K31/12, A61P19/10, A23L1/30, 2/38			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), JSTPLUS (JOIS)			
<b>C. 関連すると認められる文献</b>			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	田嶋修他, 骨粗鬆症モデルラットにおけるビールに含まれるホップ由来成分の骨密度減少抑制効果, 第57回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, 2003. 04. 01, 第203頁	1, 5-7, 11-21, 24-26, 29-30	
Y		2-4, 8-10, 22-23	
X	WO 03/014287 A1 (DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO.) 2003. 02. 20, 特にTable1, 第8頁第23行 & EP 1414937 A1	1, 5-7, 11-21, 24-26, 29-30	
Y		2-4, 8-10, 22-23	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 17. 05. 2004		国際調査報告の発送日 01. 6. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 田名部 拓也 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	STEVENS, J. F. et al., "Fate of xanthohumol and related prenyl flavonoids from hops to beer", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, Vol. 47, No. 6, p2421-2428, 特にFigure5	2-4, 8-10, 22-23
A	JP 7-285856 A (ヘキストジャパン株式会社) 1995. 10. 31, & EP 67 9393 A2	1-26, 29-30
A	JP 7-330594 A (ヘキストジャパン株式会社) 1995. 12. 19, & US 56 04263 A	1-26, 29-30



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27-28 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲27-28の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。